

PCT

WELTOORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 7 :  C12N 15/10, C12Q 1/68	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/42177  (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 20. Juli 2000 (20.07.00)
---------------------------------------------------------------------------	----	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/00052  (22) Internationales Anmeldedatum: 5. Januar 2000 (05.01.00)	(81) Bestimmungsstaaten: CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
(30) Prioritätsdaten: 199 00 638.5 11. Januar 1999 (11.01.99) DE	Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V. [DE/DE]; Hofgartenstrasse 2, D-80539 München (DE). QIAGEN GMBH [DE/DE]; Max-Volmer-Strasse 4, D-40724 Hilden (DE).	
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MÜLLER, Oliver [DE/DE]; Harnackstrasse 61a, D-44236 Dortmund (DE). SPRENGER-HAUSSELS, Markus [DE/DE]; Grünstrasse 52, D-42697 Solingen (DE). BASTIAN, Helge [DE/DE]; Benrather Schloßallee 94a, D-40597 Düsseldorf-Benrath (DE). VOLLERT, Stefanie [DE/DE]; Hainerweg 11, D-65719 Hofheim-Lorsbach (DE).	
(74) Anwälte: WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9, D-81679 München (DE).	

(54) Title: METHOD FOR ISOLATING DNA FROM BIOLOGICAL MATERIALS

(54) Bezeichnung: METHODE ZUR ISOLIERUNG VON DNA AUS BIOLOGISCHEN MATERIALIEN

(57) Abstract

The invention relates to a method for stabilizing, purifying and/or isolating nucleic acids from biological materials, especially from stool samples, which can contain impurities and interfering substances. The invention also relates to a reagent kit which is suited for carrying out the inventive method.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Stabilisierung, Reinigung oder/und Isolierung von Nukleinsäuren aus biologischen Materialien, insbesondere Stuhlproben, die Verunreinigungen und Störsubstanzen enthalten können. Weiterhin wird ein für die Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens geeigneter Reagenzienkit beschrieben.

***LEDIGLICH ZUR INFORMATION***

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		

**Methode zur Isolierung von DNA aus biologischen Materialien****Beschreibung**

5

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Stabilisierung, Reinigung oder/und Isolierung von Nukleinsäuren aus biologischen Materialien, insbesondere Stuhlproben, die Verunreinigungen und Inhibitoren bzw. Störsubstanzen enthalten können. Weiterhin wird ein für die Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens geeigneter Reagenzienkit beschrieben.

10

Zahlreiche Beispiele aus verschiedenen Forschungsbereichen belegen die Bedeutung der Analyse von Nukleinsäuren aus biologischen Materialien, die mit Substanzen verunreinigt sind, welche Nukleinsäuren während der Lagerung schädigen und eine enzymatische Manipulation der Nukleinsäuren, z.B. durch Amplifikation hemmen. Daher ist es für die Brauchbarkeit der in den biologischen Materialien enthaltenen Nukleinsäuren für weitere Analysen wichtig, daß diese Substanzen nur in sehr niedrigen Konzentrationen vorhanden sind oder gänzlich aus der Probe entfernt werden.

15

Eine besondere Bedeutung besitzt die Analyse von Nukleinsäuren aus fäkalen Proben. Eine wichtige medizinische Anwendung ist der Nachweis tumorspezifischer Veränderungen von nukleärer Human-DNA aus Stuhl, die als Parameter bei der Frühdiagnose von Tumoren des Verdauungstrakts dienen können. Ebenso gewinnt der Nachweis bakterieller und viral er Infektionserreger aus Stuhlproben durch auf Nukleinsäuren basierende Testverfahren zunehmend an Bedeutung.

20

30 Für die Aufreinigung von Nukleinsäuren aus Stuhlproben ist die Anwendung einer Kombination verschiedener Reinigungsschritte wie Proteasebehandlung, Phenol/Chloroform-Extraktion, Bindung von Nukleinsäuren an

- 2 -

Silika in Anwesenheit chaotroper Salze, Gelfiltration, Anionenaustauschchromatographie sowie der Einsatz kationischer Detergenzien bekannt. Die mit diesen Verfahren aus Stuhlproben isolierten Nukleinsäuren sind jedoch im allgemeinen instabil und verhalten sich oftmals problematisch 5 in nachfolgenden enzymatischen Reaktionen wie z.B. PCR. Ursache hierfür sind Substanzen, die zusammen mit der Nukleinsäure isoliert werden und diese schädigen sowie enzymatische Reaktionen inhibieren. Im Stuhl enthaltene Inhibitorklassen sind - soweit bekannt - Hämoglobin und dessen Metaboliten, Gallensäuren und Gallensäurederivate sowie Polysaccharide.

10

In PCT/EP/96/03595 wird ein Verfahren zur Reinigung, Stabilisierung oder/und Isolierung von Nukleinsäuren aus biologischen Materialien, insbesondere Fäkalien, beschrieben, bei dem man einer Nukleinsäuren enthaltenden Probe aus biologischen Materialien eine Adsorptionsmatrix zur 15 Bindung von Verunreinigungen zusetzt. Vorzugsweise verwendet man eine Adsorptionsmatrix auf Kohlenhydratbasis, z.B. Stärke, Cellulose, Glycogen oder/und andere biogene oder nicht biogene Kohlenhydrate oder Mischungen davon, wobei Mehle aus Getreide, Erbsen, Mais, Kartoffeln oder Bestandteile daraus oder Mischungen bevorzugt sind. Als besonders 20 geeignet zur Aufreinigung von Nukleinsäuren aus Stuhlproben haben sich Mischungen aus gereinigten Kohlenhydraten oder/und Mehlen, insbesondere Mischungen aus Cellulose und Kartoffelmehl erwiesen.

Mit dem in PCT/EP96/03595 beschriebenen Verfahren werden in manchen 25 Fällen jedoch die Nukleinsäuren schädigenden Substanzen und PCR-Inhibitoren nicht vollständig entfernt. Bei einem - variablen - Anteil von inhibitorischen Stuhlproben ist nach Aufreinigung unter Verwendung des Standardprotokolls die anschließende enzymatische Behandlung der Nukleinsäuren nicht möglich.

30

Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung war somit die Bereitstellung eines Verfahrens zur Aufreinigung von Nukleinsäuren, das die Nachteile des

- 3 -

Standes der Technik mindestens teilweise beseitigt und das insbesondere eine reproduzierbare Aufreinigung von Nukleinsäuren aus "inhibitorischen Proben" ermöglicht.

5      Überraschenderweise wurde festgestellt, daß die Aufreinigung von Nukleinsäuren auch aus inhibitorischen Proben verbessert werden kann, wenn eine oder mehrere der im folgenden genannten Maßnahmen ergriffen werden:

10     (a)    Verwendung eines Extraktionspuffers mit einem sauren bis neutralen pH-Wert,  
       (b)    Verwendung eines Extraktionspuffers mit einem hohen Salzgehalt und  
       (c)    Verwendung eines Extraktionspuffers, der eine phenolneutralisierende Substanz enthält.

15     Ein Gegenstand der Erfindung ist somit ein Verfahren zur Reinigung, Stabilisierung oder/und Isolierung von Nukleinsäuren aus biologischen Materialien, wobei man der Nukleinsäuren enthaltenden Probe einen Extraktionspuffer und eine Adsorptionsmatrix zur Bindung von Verunreinigungen zusetzt und dann die Nukleinsäuren von der Adsorptionsmatrix und daran gebundenen Verunreinigungen abtrennt, wobei der Extraktionspuffer

20     (a)    einen pH-Wert im Bereich von 2 bis 8,  
       (b)    eine Salzkonzentration von mindestens 100 mM oder/und  
       (c)    eine phenolneutralisierende Substanz enthält.

25     In einer ersten Ausgestaltungsform weist der Puffer einen pH-Wert im Bereich von 2 bis 8, vorzugsweise von 3 bis 7 und besonders bevorzugt von 4 bis 6,5 auf. Als günstig hat sich dabei die Verwendung von Acetatpuffern, z.B. Na-Acetat, erwiesen. Es können jedoch auch andere Puffer, z.B. Phosphat- oder Citratpuffer, eingesetzt werden.

- 4 -

Gemäß einer zweiten Ausgestaltungsform enthält der Extraktionspuffer eine Salzkonzentration von mindestens 100 mM, vorzugsweise von mindestens 200 mM bis maximal zur Löslichkeitsgrenze des jeweils verwendeten Salzes. Vorzugsweise wird als Salz ein Alkalihalogenid, z.B. NaCl oder KCl oder Gemische davon verwendet.

Gemäß einer dritten Ausgestaltungsform enthält der Puffer mindestens eine phenolneutralisierende Substanz. Bevorzugte Beispiele für Substanzen, die Phenole neutralisieren können, sind Polyvinylpyrrolidon (PVP) in unterschiedlichen Polymerisationsgraden, z.B. PVP-10, Reduktionsmittel, z.B. Thiolreagenzien wie  $\beta$ -Mercaptoethanol oder Dithiothreitol oder Borate. Besonders bevorzugt verwendet man Polyvinylpyrrolidon in einer Konzentration von mindestens 0,5% (Gew/Gew) bis zur Löslichkeitsgrenze.

Weiterhin enthalten die für das erfindungsgemäße Verfahren geeignete Extraktionspuffer vorzugsweise einen Chelatbildner wie etwa EDTA oder/und ein Detergenz, z.B. ein ionisches Detergenz wie SDS. Der Chelatbildner liegt vorzugsweise in einer Konzentration von 1 bis 200 mM vor. Die Konzentration des Detergenz beträgt vorzugsweise 0,1 bis 5% (Gew/Gew).

Die Adsorptionsmatrix ist derart beschaffen, daß sie in Verbindung mit dem Extraktionspuffer Verunreinigungen, die zur Schädigung von Nukleinsäuren führen oder/und die Durchführung enzymatischer Reaktionen verhindern oder/und enzymatische Reaktionen hemmen, wie etwa Abbauprodukte von Hämoglobin, z.B. Bilirubin und dessen Abbauprodukte, Gallensäuren oder Salze davon oder deren Abbauprodukte oder/und Polysaccharide und Polyphenole insbesondere pflanzlichen Ursprungs abtrennen oder neutralisieren kann. Die Verwendung einer unlöslichen Adsorptionsmatrix ist bevorzugt.

- 5 -

Bezüglich der geeigneten Adsorptionsmatrices wird auf die Anmeldung PCT/EP96/03595 verwiesen. Besonders bevorzugt werden Adsorptionsmatrices auf Basis von Kohlenhydraten verwendet, beispielsweise Mehle aus Getreide, Mais, Erbsen, Soja und insbesondere aus Kartoffeln oder Bestandteile daraus bzw. Mischungen davon. Besonders bevorzugt sind Mischungen von Mehlen mit anderen Kohlenhydraten, z.B. gereinigten Kohlenhydraten wie Cellulose.

Die Menge, in der die Adsorptionsmatrix der Probe zugesetzt wird, hängt im wesentlichen von der Beschaffenheit der Probe ab. Die Adsorptionsmatrix kann beispielsweise in einem Gewichtsanteil von 0,05:1 bis 100:1, insbesondere von 0,1:1 bis 10:1 bezüglich der Probe eingesetzt werden.

Die Nukleinsäuren enthaltende Probe stammt aus biologischen Materialien, die Nukleinsäure abbauende bzw. enzymatische Reaktionen hemmende Verunreinigungen enthalten. Vorzugsweise stammt die Probe aus Fäkalien. Sie kann jedoch auch beispielsweise aus anderen Quellen, z.B. Geweben jeder Art, Knochenmark, humanen und tierischen Körperflüssigkeiten wie Blut, Serum, Plasma, Urin, Sperma, Cerebrospinalflüssigkeit, Sputum und Abstrichen, Pflanzen, Pflanzenteilen- und extrakten, z.B. Säften, Pilzen, Mikroorganismen wie Bakterien, fossilen oder mummifizierten Proben, Bodenproben, Klärschlamm, Abwässern und Lebensmitteln stammen.

Vorzugsweise wird die Probe vor dem Zusatz der Adsorptionsmatrix im Extraktionspuffer aufgenommen und für eine jeweils gewünschte Zeitdauer vorinkubiert. Andererseits können Probe, Extraktionspuffer und Adsorptionsmatrix auch gleichzeitig zusammengegeben werden. Der Extraktionspuffer wird vorzugsweise in einem Gewichtsanteil von mindestens 0,1:1, insbesondere von 0,5:1 bis 50:1 bezüglich der Probe eingesetzt. Die Inkubation der Probe im Extraktionspuffer kann bei Raumtemperatur erfolgen und umfaßt vorzugsweise einen Homogenisierungsschritt z.B. durch Vortexbehandlung.

- 6 -

In einer Ausgestaltungsform der Erfindung kann die Inkubation unter Bedingungen erfolgen, die für eine Freisetzung der Nukleinsäuren aus dem Probenmaterial förderlich sind. Solche Inkubationsbedingungen werden insbesondere dann verwendet, wenn Nukleinsäuren aus "schwer" aufschließbaren Materialien, z.B. Zellen wie etwa Bakterien oder Parasiten oder Viren nachgewiesen werden sollen. In diesem Fall kann durch chemische, thermische oder/und enzymatische Behandlung die Freisetzung der Nukleinäsuren während der Inkubation verbessert werden, wodurch eine höhere Ausbeute an Nukleinsäuren aus dem Probenmaterial sowohl hinsichtlich Gesamt-DNA als auch spezifisch hinsichtlich der nachzuweisenden DNA erhalten wird. Vorzugsweise wird hierbei eine Temperaturerhöhung, z.B. auf  $\geq 50^{\circ}\text{C}$ , insbesondere auf  $\geq 70^{\circ}\text{C}$  vorgenommen.

Wenn andererseits Nukleinsäuren aus leicht aufschließbaren Materialien, z.B. empfindlichen Zellen wie etwa Humanzellen bestimmt werden sollen, kann die Inkubation auch bei einer verringerten Temperatur, z.B.  $\leq 10^{\circ}\text{C}$ , insbesondere  $\leq 4^{\circ}\text{C}$  erfolgen, um auf diese Weise die unerwünschte Freisetzung anderer Nukleinsäuren in der Probe zu vermeiden oder einzuschränken.

Nach Zusatz der Adsorptionsmatrix erfolgt eine weitere Inkubation der Probe. Auch diese Inkubation kann - je nach Erfordernis - bei Raumtemperatur, bei einer verringerten Temperatur oder bei für die Freisetzung von Nukleinsäuren förderlichen Bedingungen erfolgen.

Nach der Inkubation kann die Adsorptionsmatrix z.B. durch Zentrifugation von der Probe abgetrennt werden. Alternativ kann die Probe direkt mit der Adsorptionsmatrix versetzt werden, z.B. bei flüssigen biologischen Proben. Weiterhin kann die Probe über eine Adsorptionsmatrix durch Zentrifugation, durch Anlegen eines Vakuums oder/und mittels der Schwerkraft geführt

werden, wobei die Adsorptionsmatrix vorzugsweise dann abgefüllt in einer Säule vorliegt.

Die Behandlung mit Extraktionspuffer und Adsorptionsmatrix führt zu einer 5 signifikanten Stabilitätserhöhung der in der Probe enthaltenen Nukleinsäuren und bei einer anschließenden Isolierung der Nukleinsäuren zu einer besseren Reproduzierbarkeit. Dies gilt insbesondere, wenn sich an die Isolierung eine enzymatische Manipulation der Nukleinsäuren, z.B. eine Amplifikation oder/und eine Restriktionsspaltung anschließt. Besonders bevorzugt wird die 10 Amplifikation, z.B. durch PCR (Polymerase Chain Reaction), LCR (Ligase Chain Reaction), NASBA (Nucleic Acid Base Specific Amplification) oder 3SR (Self Sustained Sequence Replication) durchgeführt.

Ein besonders bevorzugter Aspekt der vorliegenden Erfindung ist - wie 15 bereits in PCT/EP96/03595 ausgeführt - die Analyse, der Nachweis oder die Isolierung von Nukleinsäuren, insbesondere DNA, aus Stuhlproben. Durch das erfindungsgemäße Verfahren sind saubere und amplifizierbare Nukleinsäuren aus fäkalen Proben erhältlich, die zum Nachweis von Mutationen, insbesondere von tumorspezifischen DNA-Mutationen 20 verwendet werden können.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Reagenzienkit zur Stabilisierung und Reinigung von Nukleinsäuren aus biologischen Materialien, umfassend:

25 (a) einen zur Aufnahme einer Nukleinsäuren enthaltenden Probe geeigneten Extraktionspuffer wie zuvor beschrieben,  
(b) eine Adsorptionsmatrix zur Bindung von Verunreinigungen aus den biologischen Materialien.

30 Die Adsorptionsmatrix kann in einer abgepackten portionierten Form, z.B. abgefüllt in einer Säule wie etwa einer zentrifugierbaren Minisäule,

- 8 -

vorliegen. Der Puffer kann in fertiger Form, als Konzentrat oder Lyophilisat vorliegen.

Vorzugsweise enthält das Reagenzienkit zusätzliche Mittel zur Reinigung

5 von Nukleinsäuren, die z.B. mineralische oder/und organische Träger sowie gegebenenfalls Lösungen, Hilfsstoffe oder/und Zubehör umfassen. Mineralische Bestandteile von Trägern können beispielsweise poröse oder nicht-poröse Metalloxide oder Metallmischoxide, z.B. Aluminiumoxid, Titandioxid oder Zirkoniumdioxid, Silicagele, Materialien auf Basis von

10 Gläsern, z.B. modifizierte oder nicht-modifizierte Glaspartikel oder Glasmehl, Quarz, Zeolithe oder Mischungen von einer oder mehrerer der oben genannten Substanzen sein. Andererseits kann der Träger auch organische Bestandteile enthalten, die z.B. aus gegebenenfalls mit funktionellen Gruppen modifizierten Latexpartikeln, synthetischen Polymeren, wie etwa

15 Polyethylen, Polypropylen, Polyvinylidenfluorid, insbesondere ultrahochmolekularem Polyethylen oder HD-Polyethylen, oder Mischungen von einer oder mehreren der zuvor genannten Substanzen ausgewählt werden.

20 Der Träger kann beispielsweise in Form von Partikeln mit einer mittleren Größe von 0,1 µm bis 100 µm vorliegen. Bei Verwendung eines porösen Trägers ist eine mittlere Porengröße von 2 µm bis 100 µm bevorzugt. Der Träger kann beispielsweise in Form loser Schüttungen von Partikeln, Filterschichten, z.B. aus Glas, Quarz oder Keramik, Membranen, z.B.

25 Membranen, in denen ein Silicagel angeordnet ist, Fasern oder Geweben aus mineralischen Trägern, wie etwa Quarz oder Glaswolle sowie in Form von Latices oder Frittenmaterialien aus synthetischen Polymeren vorliegen.

Außerdem kann das erfindungsgemäß Reagenzienkit auch Hilfsstoffe wie

30 Enzyme und andere Mittel zur Manipulation von Nukleinsäuren enthalten, z.B. mindestens einen Amplifikationsprimer und zur Amplifikation von

- 9 -

Nukleinsäuren geeignete Enzyme, z.B. eine Nukleinsäurepolymerase oder/und mindestens eine Restriktionsendonuklease.

Die Primer zur Amplifikation von Nukleinsäuren stammen 5 zweckmäßigerweise aus den zu analysierenden Genen, dh. beispielsweise aus Onkogenen, Tumorsuppressorgenen oder/und Mikrosatellitenabschnitten. zur Amplifikation von Nukleinsäuren geeignete Enzyme und Restriktionsendonukleasen sind bekannt und kommerziell erhältlich.

10 Weiterhin soll die vorliegende Erfindung durch die nachfolgenden Abbildungen und Beispiele erläutert werden. Es zeigt:

15 Abb 1.: die Amplifizierbarkeit von DNA in inhibitorischen Stuhlproben unter Verwendung eines Extraktionspuffers des Standes der Technik (Abb. 1a) und eines erfindungsgemäßen Extraktionspuffers (Abb. 1b).

### Beispiel 1

#### Analyse von DNA aus Stuhlproben

20 DNA wurde aus Stuhlproben unter Verwendung einer Adsorptionsmatrix aus Cellulose und Kartoffelmehl gereinigt und anschließend mittels PCR amplifiziert.

25 Menschliche Stuhlproben wurden gesammelt, eingefroren und bei -80°C aufbewahrt. 200 mg Stuhl wurden in ein 2 ml Mikrozentrifugengefäß gegeben und auf Eis gestellt. Dann wurde die Stuhlprobe in 600 µl Extraktionspuffer aufgenommen und die Mischung durch Vortexbehandlung für 1 min homogenisiert.

30 Die auf Kartoffelmehl und Cellulose basierende Adsorptionsmatrix (200 mg) wurde in 300 µl Extraktionspuffer aufgenommen und durch

- 10 -

Vortexbehandlung resuspendiert. Dann wurde die Matrix-Suspension dem Stuhl-Homogenisat zugesetzt und einer Vortexbehandlung für 1 min unterzogen.

5 Die Probe wurde für 5 min zur Präzipitation von Stuhlpartikeln, der Adsorptionsmatrix und anderen Verunreinigungen zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Mikrozentrifugationsgefäß überführt und für weitere 5 min zentrifugiert.

10 Die in 600  $\mu$ l des Überstands enthaltene DNA wurde mit Hilfe von Reagenzien und Zentrifugationssäulen wie folgt noch weiter aufgereinigt. Nach einer Proteinase K-Behandlung wurden die Nukleinsäuren in Gegenwart chaotroper Salze an einer Silikagelmembran einer Zentrifugationssäule gebunden und nach wiederholten Waschschritten 15 eluiert.

Anschließend wurde den DNA-Eluaten eine Matrize (eine für GFP (Green Fluorescence Protein) kodierende DNA) sowie die weiteren für dessen Amplifikation notwendigen Komponenten (Primer, Polymerase, Nukleotide, 20 Puffer) zugesetzt. Die Endkonzentration der DNA-Eluate im PCR-Ansatz betrug 10% (Vol/Vol).

Es wurden DNA-Isolate aus inhibitorischen Stuhlproben von insgesamt 19 Personen mittels PCR auf Amplifizierbarkeit getestet (Spuren 1 bis 19 in 25 Abb. 1a und b). Die Ansätze wurden nach der PCR durch Gelelektrophorese aufgetrennt und die Amplifikationsprodukte (zu erwartende Länge 771 bp) durch Ethidiumbromidfärbung visualisiert.

Als Referenz wurde ein DNA Längenmarker (M; 1 kB-Marker, Gibco BRL, 30 Bethesda Maryland) auf das Gel aufgetragen. Als Kontrolle wurden dem GFP-PCR-Ansatz anstelle der DNA-Eluate Tris-Puffer (T), eine stark inhibitorische Stuhl-DNA (I), oder eine nicht inhibitorische Stuhl-DNA (N)

- 11 -

zugefügt. Desweiteren wurde in einer Kontrollreaktion GFP ohne jegliche Zusätze (-) amplifiziert.

Bei inhibitorischen Stuhlproben konnte unter Verwendung des in 5 PCT/EP96/03595 verwendeten Stuhl-Lösepuffers (500 mM Tris HCl pH 9,0, 50 mM EDTA, 10 mM NaCl) oftmals kein Amplifikationsprodukt erhalten werden. So ist aus Abb. 1a ersichtlich, daß mit dem aus PCT/EP96/03595 bekannten Protokoll nur bei zwei von 19 getesteten Proben (Proben Nr. 4 und 15) eine Amplifikation erfolgte.

10

Überraschenderweise wurde festgestellt, daß die Amplifizierbarkeit der DNA durch Ersetzen des Standardpuffers mit einem in der folgenden Tabelle 1 gezeigten Puffer E1 bis E8 dramatisch verbessert werden konnte.

15

Tabelle 1

	NaAcetat	NaCl	KCl	EDTA	SDS	PVP-10	pH
E1	0,2 M	2,5 M	-	60 mM	1,5%	2%	6,5
E2	0,2 M	0,5 M	-	50 mM	1,4%	3%	5,0
E3	0,1 M	1,0 M	-	60 mM	1,0%	4%	6,0
E4	0,1 M	0,5 M	-	50 mM	1,4%	2%	5,5
E5	0,3 M	-	0,1 M	80 mM	1,5%	3%	6,0
E6	0,1 M	-	0,2 M	50 mM	1,4%	2%	5,5
E7	0,3 M	-	0,5 M	60 mM	1,0%	1%	4,0
E8	0,2 M	-	0,1 M	60 mM	1,0%	1%	6,5

20

Abbildung 1b zeigt, daß bei Verwendung eines erfindungsgemäßen Extraktionspuffers aus allen 19 Proben eine amplifizierbare DNA isoliert werden konnte.

25

30

- 12 -

### Beispiel 2

#### Stuhlextraktion bei erhöhter Temperatur

Für die Detektion von Nukleinsäuren aus bestimmten Zellen (z.B. Bakterien, 5 Parasiten) oder Viren ist eine Extraktion der Stuhlprobe bei erhöhten Temperaturen zweckmäßig, um eine effiziente Freisetzung der DNA zu gewährleisten.

Jeweils 1 g Stuhl wurde mit  $10^5$  Agrobakterien versetzt und entsprechend 10 der Methode in Beispiel 1 aufgearbeitet. Die Extraktion der Stuhlprobe in einem erfindungsgemäßen Puffer erfolgte dabei für 5 min bei 4°C, Raumtemperatur von 18-25°C (RT), 50°C, 70°C, 80°C oder 90°C. Die Effizienz der Lyse wurde über die Gesamt-DNA Ausbeute und die Effizienz 15 der Lyse der zugesetzten Agrobakterien über die Amplifikation einer spezifischen Agrobakteriensequenz (Vir-Gen) bestimmt. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle 2 gezeigt.

Tabelle 2

Temperatur	Gesamt-DNA Ausbeute (ng/µl)	Vir Amplifikation
4°C	115	+
RT	161	++
50°C	255	+++
70°C	536	++++
80°C	521	++++
90°C	548	++++

Den Ergebnissen liegen jeweils zwei unabhängige Stuhlextraktionen bei der angegebenen Temperatur zugrunde. Die Gesamt-DNA Ausbeute wurde über 30 OD-Messung bei 260 nm bestimmt. Die Amplifikationsprodukte wurden auf einem Agarosegel aufgetrennt. Mit + ist die Effizienz der Amplifikation bezeichnet (+ bis ++++: zunehmende Effizienz).

- 13 -

Aus Tabelle 2 ist ersichtlich, daß sowohl die Gesamt-DNA Ausbeute als auch die Bakterienlyse und somit die Amplifikationsausbeute bei einer Erhöhung der Inkubationstemperatur auf mindestens 50°C, insbesondere auf mindestens 70°C deutlich zunimmt.

**Ansprüche**

1. Verfahren zur Reinigung, Stabilisierung oder/und Isolierung von  
5 Nukleinsäuren aus biologischen Materialien, wobei man der  
Nukleinsäuren enthaltenden Probe einen Extraktionspuffer und eine  
Adsorptionsmatrix zur Bindung von Verunreinigungen zusetzt und  
dann die Nukleinsäuren von der Adsorptionsmatrix abtrennt,  
dadurch gekennzeichnet,  
10 daß der Extraktionspuffer
  - (a) einen pH-Wert im Bereich von 2-8,
  - (b) eine Salzkonzentration von mindestens 100 mM oder/und
  - (c) eine phenolneutralisierende Substanz enthält.
- 15 2. Verfahren nach Anspruch 1,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß man einen Extraktionspuffer mit einem pH-Wert von 4-6,5  
verwendet.
- 20 3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß man einen Extraktionspuffer mit KCl oder/und NaCl in einer  
Konzentration von mindestens 100 mM verwendet.
- 25 4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß man einen Extraktionspuffer mit mindestens 0,5%  
Polyvinylpyrrolidon als phenolneutralisierende Substanz verwendet.

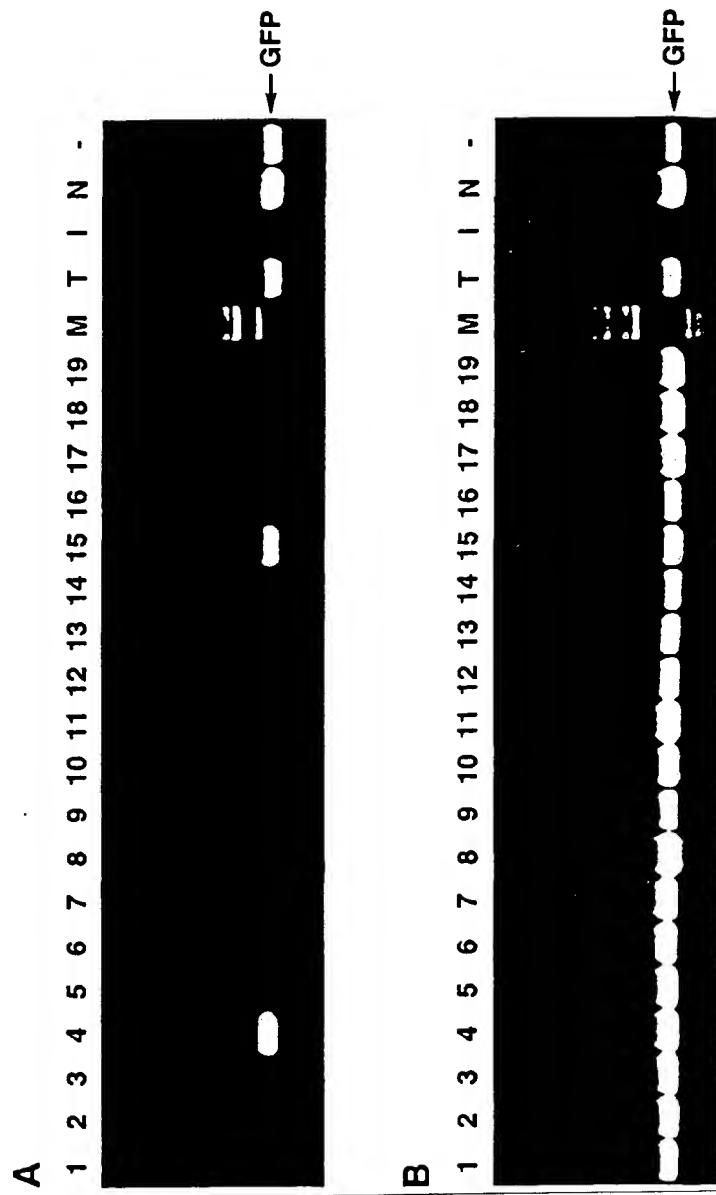
- 15 -

5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß man eine unlösliche Adsorptionsmatrix auf Kohlenhydratbasis  
verwendet.
- 10  
15 6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß man Kartoffelmehl oder Bestandteile daraus gegebenenfalls  
vermischt mit anderen Kohlenhydraten verwendet.
- 20  
25 7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß die Nukleinsäuren enthaltende Probe aus Fäkalien stammt.
8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß die Probe vor dem Inkontaktbringen mit der Adsorptionsmatrix  
im Extraktionspuffer inkubiert wird.
9. Verfahren nach Anspruch 8,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß die Inkubation bei einer Temperatur  $\leq 10^{\circ}\text{C}$  erfolgt.
10. Verfahren nach Anspruch 8,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß die Inkubation bei Bedingungen erfolgt, die für eine Freisetzung  
der Nukleinsäuren förderlich sind.
11. Verfahren nach Anspruch 10,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß die Inkubation bei einer Temperatur  $\geq 50^{\circ}\text{C}$  erfolgt.

- 16 -

12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß man die Probe durch Zentrifugation, durch Anlegen eines  
Vakuums oder/und mittels der Schwerkraft über die  
Adsorptionsmatrix führt.
13. Verwendung eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 12  
zur Analyse, zum Nachweis oder zur Isolierung von Nukleinsäuren  
aus Stuhlproben.
14. Reagenzienkit zur Reinigung, Stabilisierung oder/und Isolierung von  
Nukleinsäuren aus biologischen Materialien umfassend:
  - (a) einen zur Aufnahme einer Nukleinsäure enthaltenden Probe  
geeigneten Extraktionspuffer wie in einem der Ansprüche 1 bis  
4 definiert und
  - (b) eine Adsorptionsmatrix zur Bindung von Verunreinigungen aus  
den biologischen Materialien.

Abbildung 1



# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internales Aktenzeichen

PCT/EP 00/00052

A. KLASSEFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 7 C12N15/10 C12Q1/68

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprästoff (Klassifikationssystem und Klassifikationsymbole)

IPK 7 C12N C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprästoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	GOUVEA V ET AL: "Identification of hepatitis E virus in clinical specimens: amplification of hydroxyapatite-purified virus RNA and restriction endonuclease analysis." JOURNAL OF VIROLOGICAL METHODS, (1997 DEC) 69 (1-2) 53-61. , XP000901005 Seite 54 -Seite 55	1,2,7, 10,12,13
X	US 5 817 798 A (GUNDLING GERARD J) 6. Oktober 1998 (1998-10-06) Beispiel 4	1,8,12

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- \* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- \*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- \*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- \*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- \*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- \*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

- \*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzipiell oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- \*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- \*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- \*8\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

25. April 2000

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

03/05/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.O. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Espen, J

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

**Intert. nales Aktenzeichen**

PCT/EP 00/00052

#### C. (Fortschreibung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*		Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P, X		FLAGSTAD O ET AL: "Reliable noninvasive genotyping based on excremental PCR of nuclear DNA purified with a magnetic bead protocol." MOLECULAR ECOLOGY MAY, 1999, Bd. 8, Nr. 5, Mai 1999 (1999-05), Seiten 879-883, XP000901057 ISSN: 0962-1083 Seite 879 -Seite 880	1, 7, 8, 10, 12, 13
A		BRETAGNE S ET AL: "Detection of <i>Echinococcus multilocularis</i> DNA in fox faeces using DNA amplification." PARASITOLOGY 1993, Bd. 106, Nr. 2, 1993, Seiten 193-199, XP000901017 ISSN: 0031-1820	
A		DEUTER R ET AL: "A METHOD FOR PREPARATION OF FECAL DNA SUITABLE FOR PCR" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, GB, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, Bd. 23, Nr. 18, 25. September 1995 (1995-09-25), Seiten 3800-3801, XP002017414 ISSN: 0305-1048	
A		WO 97 07239 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT ;MUELLER OLIVER (DE); DEUTER RAINER (DE)) 27. Februar 1997 (1997-02-27)	

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Intern als Aktenzeichen

PCT/EP 00/00052

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung		Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
US 5817798	A	06-10-1998	WO	9914224	A	25-03-1999
WO 9707239	A	27-02-1997	DE	19530132	A	20-02-1997
			AU	712331	B	04-11-1999
			AU	6821696	A	12-03-1997
			CA	2228769	A	27-02-1997
			EP	0851937	A	08-07-1998
			JP	11511020	T	28-09-1999